Aus dem Hygiene-Institut
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung Medizinische Virologie
und Epidemiologie der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

HERSTELLUNG EINES HAEMAGGLUTINIERENDEN ROTAVIRUS–ANTIGENS ZUR VERWENDUNG IN DER SEROEPIDEMIOLOGIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Biol. Maria Deborah Schubert-Rajab, geb. Schubert
aus Stuttgart

1983

Aus dem Hygiene-Institut
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung Medizinische Virologie
und Epidemiologie der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

HERSTELLUNG EINES HAEMAGGLUTINIERENDEN ROTAVIRUS–ANTIGENS ZUR VERWENDUNG IN DER SEROEPIDEMIOLOGIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Biol. Maria Deborah Schubert-Rajab, geb. Schubert
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. H. Ritter
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H.-J. Gerth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. K. Wilms

Meinem Mann in Liebe gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Med. Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten (Abteilungsleiter: Prof. Dr. H.-J. Gerth) am Hygiene-Institut (Direktor: Prof. Dr. Botzenhart) in Tübingen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerth für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und seinen stets wohlwollenden und wertvollen Rat bei der Durchführung und Niederschrift der Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Privatdozent Dr. habil. B. Flehmig (Hygiene-Institut) für die freundliche Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und Herrn Dr. H. Frank (Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen) für die großzügige Hilfe bei der Herstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	Einleitung und Aufgabe	1
B	Materialien und Virusstamm	3
C	Methoden	7
C-1	Methoden der Zellzüchtung	7
C-1a	Herstellung von primären Affennieren-Zellkulturen	7
C-1b	Herstellung von Vero-Zellkulturen	7
C-1c	Herstellung von CV-1-Zellkulturen	8
C-1d	Herstellung von Frhk-4-Zellkulturen	8
C-2	Methoden der Virusvermehrung	9
C-2a	Viruszüchtung	9
C-2b	Herstellung von Impfvirus	9
C-3	Herstellung des Kontrollantigens	9
C-4	Antigenpräparationen	9
C-4a	Reinigung durch Pelletierung des Antigens durch ein Cäsiumchlorid-Kissen	10
C-4b	Reinigung durch Zentrifugation auf einen CsCl-Gradienten	10
C-5	Färbetechniken für die Elektronenmikroskopie	12
C-5a	Präparation mit Phosphorwolframsäure	12
C-5b	Präparation mit Uranylacetat	12
C-6	Herstellung von Immunseren	12
C-6a	Antigenpräparation	12
C-6b	Weitere Reinigung des Antigens und Immunisierung der Meerschweinchen	13
C-7	Herstellung eines Kontrollserums	13
C-8	Nachweis von Antigen mittels Hämagglutinationstest (HA)	13
C-8a	Präparation der Erythrozyten	13
C-8b	Technik des Testes	14
C-9	Austestung der Meerschweinchen-Seren mittels Haemagglutinations-Inhibitions-Test (HAI)	14
C-10	Austestung der Humanseren mittels HAI-Test	15

		Seite
D	Versuche und Ergebnisse	17
D-1	Virusanzucht auf unterschiedlichen Zellarten	17
D-2	Kontrolle der Virusvermehrung	18
D-2a	Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Kontrolle nach Zentrifugation durch ein CsCl-Kissen (vgl. C-4a)	18
D-2b	Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Kontrolle nach Präparation des Antigens mit der Trichlortrifluoräthylen-Methode (C-6a)	19
D-2c	Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Kontrolle nach Reinigung des Antigens über einen CsCl-Gradienten (C-4b)	19
D-3	Ergebnisse der Virusvermehrungskontrolle mittels HA	20
D-3a	Viruswachstum auf Vero-Zellen	20
D-3b	Viruswachstum auf CV-1 und Frhk-4-Zellen	20
D-4	Reinigung und Dichtebestimmung von SA-11 mittels Zentrifugation auf einen CsCl-Gradienten (vgl. C-4b)	20
D-5	Austestung der Meerschweinchen-Seren	27
D-6	Testung von Humanseren mittels HAI	29
D-7	Photos	37
E	Diskussion	39
F	Zusammenfassung	45
G	Literatur	46

A. Einleitung und Aufgabe

EINLEITUNG

Seit vielen Jahren bemüht man sich um die ätiologische Klärung der bei Säuglingen und Kleinkindern gehäuft vorkommenden nicht-bakteriellen infantilen Diarrhoe, welche oft eine lebensbedrohliche Erkrankung darstellt, die der stationären Behandlung bedarf. Den Nachweis, daß es sich bei dem verursachenden Agens um ein Virus handelt, führten 1973 als erste Bishop et al. (4) und Flewett et al. (11). Sie beschrieben das Auftreten reovirusähnlicher Partikel in der duodenalen Mucosa und in den Faeces von Patienten, die an nicht bakterieller Gastroenteritis erkrankt waren. Heute gelten diese Forschungsergebnisse als gesichert und konnten von vielen verschiedenen Forschungsgruppen nachvollzogen und weiterentwickelt werden.

Über den Namen und die Zugehörigkeit des Virus bestand lange Zeit keine Einigkeit. Bishop et al. verwendeten den Namen "Duovirus", Kapikian et al. bezeichneten es vorsichtig als "human reo-virus-like-agent" = HRVL-agent (19), während Flewett den Namen "Rotavirus" vorschlug. Diese Bezeichnung, die sich auf die Radstruktur im elektronenmikroskopischen Bild bezieht, ist inzwischen allgemein anerkannt (25). Unter den humanen Rotaviren lassen sich zwei Serotypen unterscheiden: Doppelschalige Partikel mit einem Durchmesser von 70 - 75 nm und einfachschalige Partikel mit einem Durchmesser von 60 nm (16). Morphologisch ähnelt das Virus den Reoviren und besitzt wie diese eine doppelsträngige RNS. Eine Kultivierung gelang bisher auf kontinuierlichen Gewebekulturen noch nicht, jedoch konnten sie auf primären Zellkulturen von fetalen menschlichen Intestinalzellen (30) gezüchtet werden. Damit sind sie als spezifisches Antigen für den serologischen Nachweis von Antikörpern für die Routinediagnostik bis heute nicht greifbar, weil diese Zellart für Routinezwecke nicht in Frage kommt. Das humane

Rotavirus ähnelt Viren, die bei anderen Säugetieren gefunden wurden, so dem Virus of Epizootic Diarrhoea of Infant Mice (EDIM), dem Nebrasca-Calf-Diarrhoe-Virus (NCDV) und dem Simian Rotavirus (SA-11), welches von Cercopithecus pygerythrus stammt. Diese sind vom humanen Rotavirus elektronenmikroskopisch nicht unterscheidbar und zeigen serologische Verwandtschaft aufgrund eines gemeinsamen gruppenspezifischen Antigens (6). Das Kälbervirus läßt sich auf primären Kälbernierenzellen und das Affenvirus auf Nierenzellen verschiedener Affenarten züchten, wobei Virus in großen Mengen produziert wird. Daher sind sowohl das NCDV wie auch das SA-11-Virus mit gutem Erfolg als Ersatzantigen für das menschliche Antigen verwendet worden.

AUFGABEN

In dieser Arbeit sollte

1. ein für die HAI geeignetes SA-11-Antigen hergestellt werden und
2. gezeigt werden, ob sich dieses Antigen für die Antikörperbestimmung beim Menschen eignet.

Außerdem sollte

3. eine Auswahl von Humanseren verschiedener Altersgruppen auf ihren Antikörpergehalt getestet werden, um eine epidemiologische Aussage machen zu können.

B. Materialien und Virusstamm

Soweit nicht anders angegeben, wurden Materialien der Firma Merck, Darmstadt, benutzt.

Chemikalien:

Cäsiumchlorid
Kaolin — Behring-Werke-AG, Marburg (für Röteln-HHT)

Natriumhydroxyd
Phosphorwolframsäure
Uranylacetat
Trichlortrifluoräthylen

Medien: — alle Medien: Serva, Heidelberg

MEM/Hanks'
(Eagle's Minimum Essential
Medium mit Hanks' Salzen)

MEM/Earle's
(Eagle's Minimum Essential
Medium mit Earle's Salzen)

Hanks' Salzlösung

Stammlösung A:
160 g NaCl
8 g KCl
4 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

in 800 ml Aqua bidest lösen, dann 2,8 g $CaCl_2$ in 200 ml Aqua bidest lösen, und alles mit 2 ml Chloroform mischen.

Stammlösung B:

3,04 g $Na_2 HPO_4 \cdot 12 H_2O$
1,2 g $KH_2 PO_4$
20,o g $C_6 H_{12} O_6$

in 800 ml Aqua bidest lösen. Plus 100 ml 0,4 %ige Phenolrotlösung, auf 1000 ml auffüllen und 2 ml Chloroform zugeben.

Gebrauchslösung:

50 ml Stammlösung A plus
50 ml Stammlösung B plus
900 ml Aqua bidest plus
100 IE/ml Penicillin G plus
100 γ/ml Streptomycin.

Medienzusätze:

Fetales Kälberserum (FKS)	Flow Laboratories, Bonn
Kälberserum (KS)	Flow Laboratories, Bonn
Lactalbumin-Hydrolysat	Difco Laboratories, Michigan, USA
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	Flow Laboratories, Bonn
Trypsin	Serva, Heidelberg 2,5 g Trypsin in 1000 ml PBS plus 100 IE/ml Penicillin G plus 100 γ/ml Streptomycin. (Filtration mit Membranfilter, Porengröße 22 nm).
Versene-Trypsin	Versene-Lösung: 0,2 g Titriplex III in 100 ml PBS lösen, dann 1 Teil Trypsin-Lösung mit 2 Teilen Versene-Lösung mischen.

Verschiedenes:

Berghof BM 1000-Filter	Fa. Berghof, Tübingen
Freunds Adjuvans	Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan, USA
Mikrotiter-V-Platten	Fa. Greiner, Nürtingen
Menschliches Blut der Blutgruppe 0	Institut für Transfusionswesen der Universität Tübingen
PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,2	8,0 g Na CL 0,2 g KCL 2,898 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 0,2 g KH_2PO_4 in 1000 ml Aqua bidest lösen.
Reaktionsgefäße 3810, 1,5 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
ACD-Blut	8 ml Blut werden mit 2 ml Citrat-Dextrose-Puffer versetzt.
ACD-Puffer	Dextrose 1,47 g Tri-Na-Citrat 1,32 g Acidum citricum 0,48 g in Aqua bidest (100 ml) lösen.

Zellen:

Cv-1-Zellen (Dauerlinie von Cercopithecus äthiops-Nieren-Zellen)	Flow Laboratories, Bonn
Frhk-4-Zellen (Dauerlinie, gewonnen aus den Nieren eines Macacus Rhesus-Feten)	American Type-Culture Collection
Vero-Zellen (Dauerlinie, gewonnen aus Cercopithecus äthiops-Nieren-Zellen)	Flow Laboratories, Bonn
primäre Affennierenzellen (Cercopithecus äthiops-Nieren-Zellen)	Flow Laboratories, Bonn

Virusstamm:

Simian Rotavirus SA-11, das von Cercopithecus pygerythrus stammt. Das Virus wurde freundlicherweise von Frau Dr. L. Brade, Institut für Med. Mikrobiologie und Virologie der Universität, 4000 Düsseldorf 1, Moorenstr. 5, zur Verfügung gestellt.

C Methoden

C-1 Methoden der Zellzüchtung

C-1a Herstellung von primären Affennieren-Zellkulturen

Primäre Affennierenzellen, die von Cercopithecus äthiops, der grünrückigen Meerkatze, stammen, werden von der Firma Flow Laboratories, Bonn, als Suspension von ca. 10^6 Zellen/ml geliefert. Diese Suspension wird 1:3 ausgesät. Als Medium wird TC-199 Hanks' mit 10 % FKS verwendet. Nach fünf Tagen kann die inzwischen dicht gewachsene Zellkultur angeimpft werden.

C-1b Herstellung von Vero-Zellkulturen

Im Hygiene-Institut wird eine Vero-Zellinie gezüchtet. Bei der Verpflanzung wird wie folgt vorgegangen:

1. Überstand der Zellkulturflasche abziehen.
2. 6 bis 7 ml vorgewärmtes Trypsin (0,25 %ige Lösung in PBS) zugeben, Flasche leicht schütteln, dann Trypsin abziehen und verwerfen. Dieser Schritt dient zur Reinigung und zur Entfernung toter Zellen aus der Zellkultur. (Die hier angegebenen Mengen gelten für Vierkantflaschen von 11,5 cm x 4,5 cm Grundfläche. Für Roux-Flaschen ist die doppelte Menge anzusetzen).
3. 13 ml vorgewärmtes Trypsin (0,25ige Lösung in PBS) auf die Zellen geben, leicht schütteln und ca. 5-10 Minuten bei 37°C inkubieren.
4. Inzwischen werden frische Kulturflaschen (z.B. Vierkantflaschen oder Roux-Flaschen) und Zentrifugengläschen bereitgestellt.
5. Mikroskopische Kontrolle, um festzustellen, wieviele Zellen bereits abgelöst sind. Sind weniger als 3/4 aller Zellen gelöst, so wird die Flasche weitere fünf Minuten inkubiert.
6. Überstand mit der Pipette abziehen und in sterile Zentrifugengläschen geben. Die Kulturflasche mit 10 ml MEM/Hanks' nachspülen und ebenfalls in das Zentrifugengläschen geben.

7. Fünf Minuten in der Kühlzentrifuge (Stock Marburg) bei 1-4°C Stufe 2 ≙ ca. 2500 UpM ≙ ca. 1500 g zentrifugieren.
8. Überstand vorsichtig abziehen.
9. Jeweils 12 ml MEM/Hanks'-Medium mit 10 % FKS in die Vierkantflasche geben. Die zentrifugierten Zellen in 5 ml MEM/Hanks' mit 10 % KS aufnehmen. Die Hälfte dieser Zellsuspension in eine der mediumgefüllten, sterilen Vierkantflaschen geben.
10. Flaschen verschließen und mit Datum, Anzahl der Passagen und Zellart beschriften.
Nach vier Tagen bildet sich ein dichter Zellrasen, der entweder wieder umgepflanzt oder mit Virusmaterial inokuliert wird.

C-1c Herstellung von CV-1-Zellkulturen

Von der Firma Flow Laboratories, Bonn, wurden CV-1-Zellen, die von Ceropithecus äthiops, der grünrückigen Meerkatze, abstammen, bezogen. Originalmedium: MEM/Earle's, 1 % NEAA, 10 % FKS. Diese Medienkombination wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Verpflanzung erfolgte analog der Vero-Zellverpflanzung, jedoch mußte statt Trypsin, welches die Zellen zu stark angriff, Versene-Trypsin verwendet werden. Dies löst die Zellen schneller ab und kann deswegen sofort wieder abgezogen werden. Nach der Ablösung werden die Zellen in einigen ml Erhaltungsmedium aufgenommen und 1:2 umgepflanzt.

C-1d Herstellung von Frhk-4-Zellkulturen

Die im Hygiene-Institut gezüchteten Frhk-4-Zellen sind von fetalen Rhesusaffen stammende Nierenzellen. Sie wurden analog den CV-1-Zellen umgepflanzt. Als Medium wurde MEM/Earle's, 0,5 % Lactalbumin-Hydrolysat und 10 % FKS verwendet.

C-2 Methoden zur Virusvermehrung

C-2a Viruszüchtung

Die verwendeten Zellkulturen wurden vor der Inokulation mit Virusmaterial dreimal mit Hanks' Salzlösung gewaschen, um Virusinhibitoren im restlichen Kälberserum des Anwachsmediums zu entfernen. Das Waschmedium wurde entfernt und danach mit der jeweiligen SA-11-Virusmenge beimpft. Nach Almeida & Hall (2) wurde zum Inokulum 10 µg Trypsin/ml zugegeben. Die beimpfte Zellkultur wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Absorptionszeit), bevor angewärmtes Erhaltungsmedium, ebenfalls mit 10 µl Trypsin/ml versehen, zugegeben wurde.

C-2b Herstellung von Impfvirus

Sowohl von den beimpften primären Affennierenzellen als auch von den beimpften Vero-Zellen wurden nach ca. vier Tagen, nachdem der größte Teil der Zellen abgelöst war und sich ein deutlicher cytopathischer Effekt gezeigt hatte, Impfvirus hergestellt. Dazu wurden die Zellen steril abzentrifugiert (30 Minuten bei 3000 UpM in einer Hettich-Rotixa/K-Zentrifuge). Das Sediment wurde in wenig Medium aufgenommen, 5mal im Methanolbad kurz eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen aufzubrechen und dann nochmals 30 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die Überstände wurden nun vereinigt und in Ampullen abgefüllt. Diese wurden in der Kühltruhe bei -70°C aufbewahrt.

C-3 Herstellung des Kontrollantigens

Kontroll-Antigene wurden in gleicher Weise wie unter C-2a beschrieben, jedoch ohne Virusinokulation, hergestellt.

C-4 Antigenpräparationen

Zur Reinigung des Virus wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

C-4a Reinigung durch Pelletierung des Antigens durch ein Cäsiumchlorid-Kissen

In der Annahme, daß sich das Virus hauptsächlich im Medium befände, wurde bei dieser Methode die beimpfte und inzwischen aus abgelösten Zellen bestehende Zellkultur 30 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde 5 mal kurz eingefroren und wieder aufgetaut und dann nochmals 30 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Das Sediment (grobe Zelltrümmer) wurde verworfen und die beiden Überstände vereint. Dieser vereinte Überstand wurde nun zur Reinigung von feinen Zelltrümmern 30 Minuten bei 10 000 UpM in einer Beckman-Ultrazentrifuge L 50 b mit Rotor SW 40 zentrifugiert. Nun folgte die Einengung und weitere Reinigung des Mediums durch Filtration durch einen Berghof BM 1000-Filter, welcher Moleküle bis zur Größe des Hämoglobins abtrennt. Dabei wurde das Medium bis auf 1/10 seines Volumens eingeengt. 2,5 ml dieses eingeengten Mediums wurden in einem Zentrifugengläschen auf 2 ml einer CsCl-Lösung der Dichte 1,28 g/ml (5) aufgeschichtet. Die anschließende Zentrifugation erfolgte über 18 Stunden in einer Beckman Ultrazentrifuge L 50 b bei 25 000 UpM = 60 000 g mit Rotor 65. Nach der Zentrifugation wurden das in der obersten Zone liegende Medium, eine mittlere Schmutzzone zwischen Medium und CsCl-Lösung und die CsCl-Lösung getrennt abgezogen. Ein sichtbares Pellet hatte sich nicht gebildet. Jedoch wurde die Fraktion vom Boden in 1 ml PBS aufgenommen und zwei Tage zur Lösung bei 4°C inkubiert. Alle Fraktionen wurden mit HA-Test und EM auf ihren Virusgehalt geprüft.

C-4b Reinigung durch Zentrifugation auf einen CsCl-Gradienten

Hierzu wurde ein CsCl-Gradient mit einer Dichteabstufung von 1,1 - 1,5 g/cm³ (= 12,5 % - 65 % des Sättigungswertes) hergestellt.

Technik:

Herstellung zweier Lösungen

1. Lösung 1,1 g CsCl/cm³ PBS ≙ 12,5 % v/v
2. Lösung 1,5 g CsCl/cm³ PBS ≙ 65,0 % v/v

Die Dichte der Lösungen wurde mit einem Refraktometer kontrolliert. Die Gradientenherstellung erfolgte mit einem im Hygiene-Institut hergestellten Gradientenmischgerät. Dabei werden zwei hintereinandergeschaltete, jedoch durch Schrauben isolierbare Gefäße mit gleicher Menge CsCl-Lösung gefüllt. Das vordere enthält die dichtere, das hintere die weniger dichte Lösung. Verbunden sind beide Gefäße durch ein dünnes Röhrchen, welches in ein Zentrifugengläschen mündet. Stellt man nun das Gerät auf einen Magnetrührer und löst die beiden Isolierschrauben gleichzeitig, so bildet sich im Zentrifugengläschen ein linearer Gradient. Im Versuch wurden Zellulosenitrat-Zentrifugenröhrchen von ca. 13 ml Volumen verwendet.

Auf den CsCl-Gradienten wurde vorsichtig 1 ml Rohantigen aufgeschichtet.

Die Vorbereitung des Antigens erfolgte in gleicher Weise wie die Vorbereitung des Antigens für den HA-Test (vgl. C-6a). Der Gradient wurde nun über 24 Stunden bei 10°C und 35.000 UpM in der Beckman Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wurden von jedem Zentrifugenröhrchen 24 Fraktionen angefertigt, indem jeweils 1/2 ml vorsichtig mit einer Spritze von oben abgezogen wurde. Die Fraktionen wurden in Reaktionsgefäßen von 1,5 ml aufbewahrt. Die Dichtebestimmung der Fraktionen erfolgte wieder mittels Refraktometer.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit HA und elektronenmikroskopisch auf ihren Virusgehalt geprüft.

C-5 Färbetechniken für die Elektronenmikroskopie

Die Färbungen für die EM wurden mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat durchgeführt.

C-5a Präparation mit Phosphorwolframsäure

Kohle-verstärkte Formvar-Netzchen wurden mit einem Tropfen Virusmaterial beladen. Nach einer Minute waren die partikulären Bestandteile adsorbiert und der Tropfen wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette oder mit Fließpapier von der Seite abgesaugt. Nun wurde ein Tropfen doppelt destilliertes Wasser aufgegeben und gleich wieder abgesaugt. Danach wurde ein Tropfen Phosphorwolframsäure (1 %, pH 7,2) als Negativkontrastmittel auf das Netzchen gegeben und nach 20 Sekunden mit Fließpapier wieder abgesaugt.

C-5b Präparation mit Uranylacetat

(Vgl. C-5a) Nach Absaugen der Virussuspension und Waschen mit doppelt destilliertem Wasser wurde Uranylacetat (1 %, pH 4,3) aufgegeben und nach 20 Sekunden abgesaugt.

C-6 Herstellung von Immunseren

Es wurden insgesamt drei Meerschweinchen immunisiert. Zwei Meerschweinchen wurden mit Antigen, welches auf Frhk-4-Zellen gewachsen war, das dritte mit Antigen von CV-1-Zellen stammend, geimpft. Allen drei Meerschweinchen wurde vor der Immunisierung unter Äthernarkose 5 ml Blut durch Herzpunktion für das Präserum abgenommen.

C-6a Antigenpräparation

Beimpfte Zellkulturen wurden abgeerntet, nachdem sich fast alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Der Flascheninhalt wurde 45 Minuten bei 15.000 UpM in der Beckman-Ultrazentrifuge Rotor 30 zentrifugiert. Der Überstand wurde zur elektronenoptischen Prüfung aufgehoben

(vgl. D-2b). Das Pellet wurde in einer geringen Menge (0,5 - 1 ml) doppelt destilliertem Wasser aufgenommen und 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Probe zu gleichen Teilen mit Trichlortrifluoräthylen (Tctfä) ausgeschüttelt und 5 Minuten bei Stufe II (Stockzentrifuge) zentrifugiert. Dabei setzten sich Tctfä und darin gelöste Lipidbestandteile unten ab und der Überstand mit dem Antigen konnte abgezogen werden. Zwischen den beiden Phasen bildete sich eine Schmutzzone aus (vgl. D-2b).

C-6b Weitere Reinigung des Antigens und Immunisierung der Meerschweinchen

Das so erhaltene Antigen wurde nun über einen CsCl-Gradienten wie in C-4b beschrieben gereinigt. Die CsCl-Fraktionen mit dem höchsten Virustiter wurden gepoolt und in einem Dialyseschlauch 12 h lang gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde zu gleichen Teilen mit Freunds komplettem Adjuvans emulgiert und den Meerschweinchen subcutan injiziert. Jedes Meerschweinchen erhielt über einen Zeitraum von drei Monaten verteilt 5 weitere Injektionen von jeweils 2 ml Emulgat.
Nach drei Monaten wurde den Tieren unter Äthernarkose durch Herzpunktion Blut abgenommen, wobei sie starben.

C-7 Herstellung eines Kontrollserums

Die Herstellung erfolgte gleich wie die der Testseren, jedoch wurden zur Antigenherstellung unbeimpfte Zellkulturen verwendet.

C-8 Nachweis von Antigen mittels Hämagglutinationstest (HA)

C-8a Präparation der Erythrozyten

1 ml ACD Blut (8 ml Blut wurden mit 2 ml Citrat-Dextrose-Puffer versetzt) der Blutgruppe 0 wurde dreimal mit PBS gewaschen. (Wassermann-Röhrchen mit 1 ml Blut und 7 ml PBS füllen, mischen, 10 Minuten bei Stufe II der Stockzentrifuge abzentrifugieren, Überstand abziehen). Davon wurde eine 0,5%ige Suspension in PBS hergestellt.

C-8b Technik des Testes

Für den Test wurden Mikrotiter-V-Platten verwendet, in denen Verdünnungsreihen des Antigens mit dem Faktor 1:2 hergestellt wurden. Begonnen wurde mit 1:2, in Mengen von 0,05 ml der Verdünnungsflüssigkeit PBS.

Jede Vertiefung erhielt nun noch 0,05 ml Erythrozytensuspension. Nach einer Stunde Inkubationszeit konnte abgelesen werden. Verschiedene Inkubationstemperaturen wurden ausprobiert: 4°C, 33°C, 37°C und Zimmertemperatur. Bei Zimmertemperatur konnten die Ergebnisse am schnellsten abgelesen werden.
Für die Erythrozytenkontrolle verwendet man jeweils nur 0,05 ml PBS und 0,05 ml Erys.
Findet eine Agglutination der Erythrozyten statt, so lagern sich die verklumpten Erys als gleichmäßiger Bodensatz ab. Verläuft der Test negativ, so setzen sie sich an der tiefsten Stelle des Bodens punktförmig zusammen ab.

C-9 Austestung der Meerschweinchenseren mittels Haemagglutinations-Inhibitions-Test (HAI)

Nach Martin et al. (22) wurde Präserum und Immunserum der Meerschweinchen mit Kaolin absorbiert, um unspezifische Erythrozytenagglutinations-Hemmstoffe zu eliminieren. Dazu wurden jeweils 0,3 ml Kaolin-Suspension (250 mg/ml) mit 0,05 ml Serum gut vermischt und 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nun wurden 0,15 ml einer 5%igen Erythrozytensuspension dazu gegeben und vorsichtig gemischt. Somit entstand eine Serumverdünnung von 1:10. Nach abermals 15 Minuten Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurde 3-5 Minuten lang in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand für den HAI-Test verwendet.
Die Antigenverdünnungen wurden in verschiedenen Ansätzen auf 8 Einheiten, 32 Einheiten, 64 Einheiten und 128 Einheiten eingestellt.

Der HAI-Test wird ähnlich dem HA-Test vorbereitet, er unterscheidet sich nur im Inhalt der Vertiefungen: Sie enthalten jeweils 0,025 ml Puffer, 0,025 ml Serum, welches durch Passagen verdünnt wird und 0,025 ml Antigen. Nun wird 60 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert (22). Nach Zugabe von jeweils 0,05 ml 0,5%iger Erythrozytensuspension und weiteren 60 Minuten Inkubationszeit kann abgelesen werden.
Dieser Test wurde sowohl mit Meerschweinchen-Präserum als auch mit Meerschweinchen-Immunserum durchgeführt. Folgende Kontrollen wurden dabei angesetzt:

1. Serumkontrolle: Sie enthält die Serumverdünnung, Puffer und Erythrozyten.
2. Präserumkontrolle: Sie enthält Präserum, Antigen und Erythrozyten.
3. Erythrozytenkontrolle, die Erythrozyten und Puffer enthält.

C-10 Austestung der Humanseren mittels HAI-Test

Die Humanseren mußten vor der Austestung ebenfalls mit Kaolin absorbiert werden. Im Ansatz befanden sich dabei 0,05 ml Serum, 0,2 ml Puffer und 0,25 ml Kaolin, sodaß sich auch hier das Serum in einer Gesamtverdünnung von 1:10 befand. Der Ansatz wurde gut vermischt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Zimmertemperatur in der Eppendorfzentrifuge bei 2000 UpM 5 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde für den HAI-Test verwendet. Das Antigen wurde verdünnt, bis es 8 Einheiten enthielt. In jedes Loch der Mikrotiterplatte wurde 0,025 ml PBS gegeben. In das erste Loch kamen nun 0,025 ml Serum. Nach Durchmischung wurde eine Verdünnungsreihe durch Passage von jeweils 0,025 ml Serumverdünnung hergestellt. Schließlich wurde zu jeder Verdünnung noch 0,025 ml Antigen gegeben.

Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurden noch 0,05 ml 0,5%ige Erythrozytensuspension zugegeben. Für die Serumkontrolle wurden 0,025 ml Puffer, 0,025 ml Serum und 0,05 ml Erys verwendet. Nach einer Stunde wurde abgelesen.

Parallel dazu wurden Kontrollen mit Meerschweinchenseren (Präserum und Immunserum), eine Humanserumkontrolle und eine Erythrozytenkontrolle angesetzt.

D. Versuche und Ergebnisse

D-1 Virusanzucht auf unterschiedliche Zellarten

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von M. Estes et al. (10) wurden bei CV-1-Zellen im HA-Test sehr hohe Titer erreicht (vgl. auch Photos), und gleich hohe Titer erreichten auch Frhk-4-Zellen.

Vero-Zellen-Präparationen reagierten im HA-Test nicht, und bei der elektronenmikroskopischen Kontrolle waren nur wenige Viren zu sehen (ca. 20 Viren pro Quadrat des Netzchens). Die Ergebnisse mit primären Affennierenzellen waren bei der elektronenmikroskopischen Kontrolle besser, jedoch wurden primäre Zellen wegen des hohen Kostenaufwandes nur zur Anzucht des Impfvirus und im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr verwendet.

Bei der elektronenoptischen Betrachtung fiel auf, daß sich die Viren hauptsächlich an Zelltrümmer angelagert befanden. Dies führte zu der Annahme, daß die Präparationsweise, wie in C-4a beschrieben (Verwerfen der Zelltrümmer) ungeeignet sei.

Im folgenden wurde eine neue Methode angewandt, die in C-6a beschrieben wurde (22).
Sie trägt dem Umstand Rechnung, daß der größte Teil des Antigens an Zelltrümmern hing (10).

D-2 Kontrolle der Virusvermehrung

D-2a Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Kontrolle nach Zentrifugation durch CsCl-Kissen (vgl. C-4a)

	Verozellen	prim. Affennierenzelle	Viruspartikel /Quadrat
In PBS aufgenommenes Pellet	ca. 2	ca. 5	"
Filtrat	0	0	"
Überstand (Medium) (= obere Phase)	3	0	"
CsCl-Kissen (untere Phase)	0	6	"
Schmutzzone zwischen Überstand und CsCl-Kissen	4	7	"
Impfvirus (vgl. C-2b)	5	20	"

Die unterschiedlichen Netzchenpräparationen mit UA und mit PWS zeigten im Ergebnis keine Unterschiede.

Aus diesem Ergebnis geht hervor, daß nicht nur Präparationsmethoden, sondern auch die Reinigungsmethode durch Zentrifugation durch ein CsCl-Kissen (C-4a) ungeeignet war, da durch sie das Virus nicht sauber abgetrennt werden konnte, sondern über alle Fraktionen verschmiert gefunden wurde.

D-2b Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Kontrolle nach Präparation des Antigens mit der Trichlortrifluoräthylen-Methode (C-6a)

	Verozellen	Viren/Quadrat
Überstand nach Zentrifugation (45 Minuten bei 15.000 UpM)	3	"
Antigenphase (nach Ausschütteln und Zentrifugation)	20-50	"
Schmutzzone	5	"
Tctfä-Phase	5	"

Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß mit der hier ausprobierten Methode weitergearbeitet werden konnte, da sich das Virus hauptsächlich in einer Phase angereichert hatte.

D-2c Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Kontrolle nach Reinigung über einen CsCl-Gradienten (C-4b)

Diese Methode wurde nur an Virus von CV-1- und Frhk-4-Zellen ausprobiert.
Im Elektronenmikroskop zeigte sich, daß die meisten Viruspartikel unverletzt mit intaktem äußeren Capsid geblieben waren. Ein Teil jedoch hatte einen dunklen Kern, was wohl als Verlust des inneren Capsids zu interpretieren ist. Außerdem waren freie Capsomere und Capsid-Teile sichtbar.
Die Anzahl der Viruspartikel wurde auf 10^8 - 10^{10} Partikel/ml geschätzt (vgl. Photos).

D-3 Ergebnisse der Virusvermehrungskontrolle mittels HA

D-3a Viruswachstum auf Vero-Zellen

Wurden Vero-Zellen zur Virusvermehrung verwendet, so ergaben sich bei Präparation nach C-4a und C-6a immer negative HA-Tests.
Der mit Vero-Zellen erreichbare Titer war nicht ausreichend für den HA-Test.

D-3b Viruswachstum auf CV-1 und Frhk-Zellen

Die beiden Zellinien wurden nach C-6a vorbereitet. Dabei ergaben sich im HA-Test Titer bis 1:512.

Nach den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie und des HA-Tests wurde die Arbeit mit auf CV-1 und Frhk-4-Zellen gewachsenem und nach C-6a präpariertem Antigen fortgeführt.

Als weiterer Reinigungsschritt wurde nun die Zentrifugation auf einen CsCl-Gradienten eingeschaltet, um mit diesem hochgereinigten Antigen Meerschweinchen-Antisera herzustellen.

D-4 Reinigung und Dichtebestimmung von SA-11 mittels Zentrifugation auf einen CsCl-Gradienten (vgl. C-4b)

Folgende Antigenproben wurden zur Dichtebestimmung verwendet:

Probe 1:	SA-11, vermehrt auf Frhk-4-Zellen	(Abb. 1)
Probe 2:	SA-11 vermehrt auf CV-1-Zellen	(Abb. 2)
Probe 3:	SA-11 vermehrt auf Frhk-4-Zellen	(Abb. 3)

Nach der Zentrifugation des Gradienten waren deutlich zwei schmale opaleszierende Banden sichtbar, von denen sich nur eine als HA-positiv herausstellte (17). Eventuell enthielt die zweite Bande, die sich im Bereich niedrigerer

Dichte befand, unvollständige Viruspartikel, da die Haemagglutination an das intakte äußere Capsid und damit an das vollständige Virus gebunden ist.

In den Abb. 1-3 sind die haemagglutinierenden Einheiten und die Dichte jeder Fraktion der drei verschiedenen Proben in Diagrammen zusammengefaßt.

Ergebnisse der HA-Austestung der Fraktionen des CsCl-Dichtegradienten

Probe Nr. 1 (= SA-11, vermehrt auf Frhk-4-Zellen)

Dichte-Fraktion	Verdünnungsstufen 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1	I	0	0	0	0	0	0	0	0
2	IIII	IIII	0	0	0	0	0	0	0
3	IIII	IIII	0	0	0	0	0	0	0
4	IIII	IIII	0	0	0	0	0	0	0
5	IIII	IIII	0	0	0	0	0	0	0
6	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
7	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
8	IIII	IIII	I	0	0	0	0	0	0
9	IIII	IIII	III	0	0	0	0	0	0
10	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
11	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
12	IIII	IIII	IIII	IIII	0	0	0	0	0
13	IIII	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0
14	IIII	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0
15	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	I	0
16	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0
17	IIII	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0	0
18	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0	0	0
19	IIII	IIII	IIII	0	0	0	0	0	0
20	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0	0	0
21	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0	0	0
22	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0	0	0

Der Grad der Agglutination wird in vier Intensitätsgraden unterteilt; dabei bedeutet I = geringe Agglutination; II = mäßige Agglutination; III = gute Agglutination; IIII = maximale Agglutination

Probe Nr. 2 (= SA-11, vermehrt auf CV-1-Zellen)

Dichte-Fraktion	Verdünnungsstufen 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1	IIII	0	0	0	0	0	0	0	0
2	III	0	0	0	0	0	0	0	0
3	IIII	II	0	0	0	0	0	0	0
4	IIII	III	0	0	0	0	0	0	0
5	IIII	II	0	0	0	0	0	0	0
6	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
7	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
8	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
9	IIII	IIII	II	II	0	0	0	0	0
10	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
11	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0
12	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0
13	IIII	IIII	IIII	III	0	0	0	0	0
14	IIII	IIII	IIII	III	0	0	0	0	0
15	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	I	0
16	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0
17	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0
18	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0
19	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0
20	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0
21	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0
22	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0

Probe Nr. 3 (= SA-11, vermehrt auf Frhk-4-Zellen)

Dichte-Fraktion	Verdünnungsstufen									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1o24
1	IIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	IIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	IIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	IIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
12	0	IIII	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0
13	II	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	0	0	0
14	I	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	II
15	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	0	0
16	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0
17	IIII	IIII	IIII	IIII	IIII	I	0	0	0	0
18	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
19	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
20	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
21	IIII	IIII	IIII	II	0	0	0	0	0	0
22	IIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0

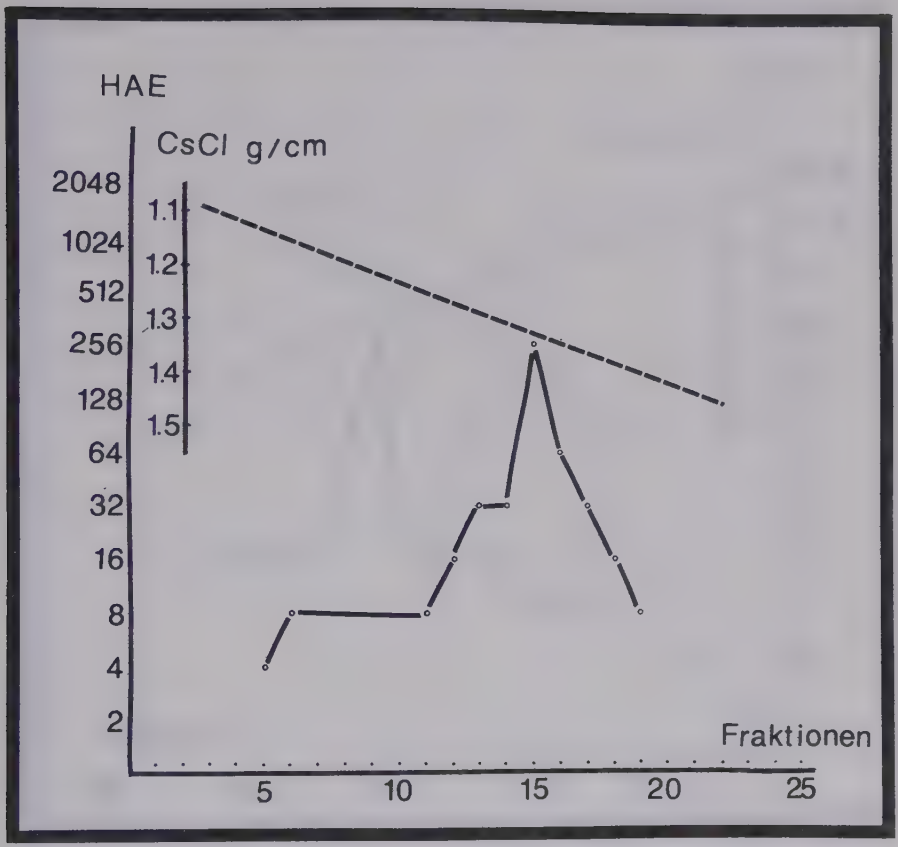


Abb.1

Für Abb. 1–3 gilt:

------ Dichte der Fraktionen

——— Hämagglutinierende Einheiten (HAE) der Fraktionen

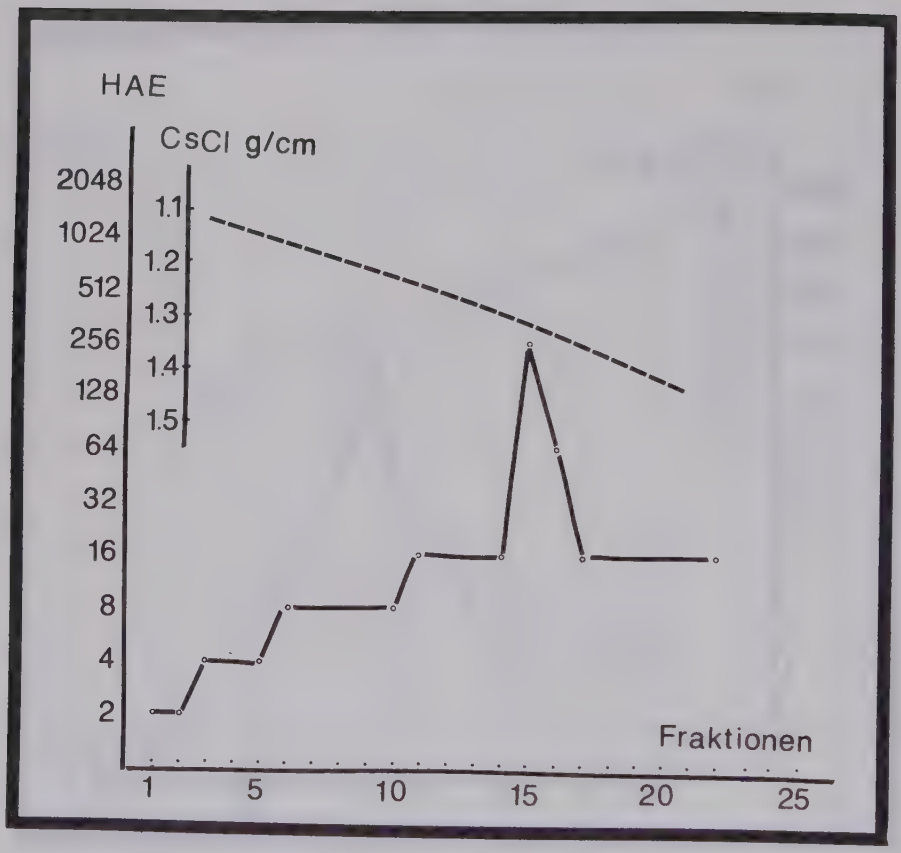

HAE
CsCl g/cm
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
Fraktionen
1
5
10
15
20
25

Abb. 2

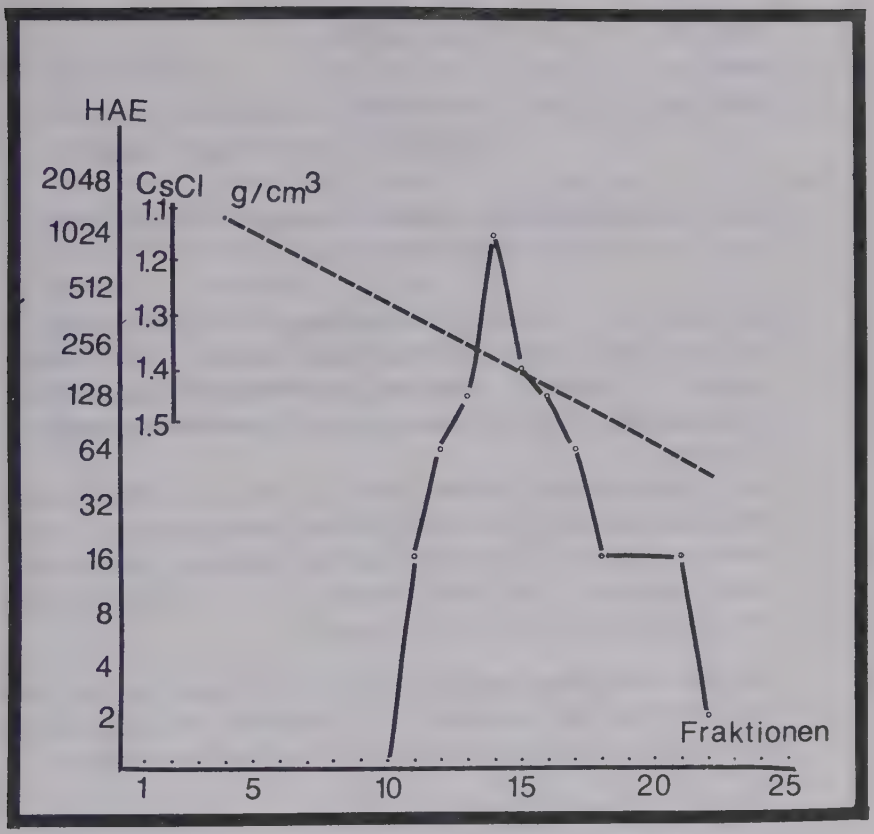

HAE
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
CsCl
g/cm3
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
Fraktionen
1
5
10
15
20
25

Abb.3

Das Maximum des Peaks ergab sich bei

Probe Nr. 1	bei	1,314 g/cm³
Probe Nr. 2	bei	1,328 g/cm³
Probe Nr. 3	bei	1,308 g/cm³
		3,950 g/cm³ : 3 = 1,316 g/cm³

Diese Dichtebestimmung stimmt überein mit den von Kalica et al. gefundenen Werten (17).

Von Probe Nr. 1 wurden die Fraktionen 12-18, von Probe Nr. 2 die Fraktionen 15-18 und von Probe Nr. 3 die Fraktionen 11-17 gepoolt. Nach Dialyse gegen PBS zeigten die Antigenproben einen Refraktionskoeffizienten von 1,335 = 0 % CsCl.
Das hochgereinigte Antigen wurde nun mit Freunds Adjuvans emulgiert und jeweils verschiedenen Meerschweinchen subkutan injiziert. Dabei wurde bei der späteren Boosterung darauf geachtet, daß jedes Meerschweinchen immer nur Antigen von der gleichen Zellart bekam.

Bei der Herstellung weiteren Antigens wurden jeweils drei Fraktionen um die Dichte ϱ = 1,32 gepoolt und nach Dialyse zur Meerschweinchen-Boosterung und zur HAI verwendet.

D-5 Austestung der Meerschweinchen-Seren

Bei der Austestung der Meerschweinchen-Seren, welche nach 5 Booster-Injektionen abgenommen worden waren, ergaben sich bei Verwendung von 8 Antigen-Einheiten durchweg hohe Titer von bis zu 1:512.

D-6 Testung von Humanseren mittels HAI

Getestet wurden:

40 Seren von Frühgeborenen	(Univ-Kinderklinik Tüb.)
26 Seren von Neugeborenen u.Säuglingen	(" " ")
21 Seren von 1-2jährigen Kindern	(Hygiene-Institut Tüb.)
38 Seren von 2-3jährigen Kindern	(" " ")
38 Seren von 3-4jährigen Kindern	(" " ")
39 Seren von 4-5jährigen Kindern	(" " ")
49 Seren von 5-6jährigen Kindern	(" " ")
40 Seren von 6-1ojährigen Kindern	(" " ")
50 Seren von 11-2ojährigen Jugendl.	(" " ")
50 Erwachsenenseren	(Blutbank Tübingen)

Zusammenfassung der Ergebnisse

Frühgeborene : n = 40

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	23	57,5 %	57,5
1: 10	1	2,5 %	60,0
1: 20	4	10,0 %	70,0
1: 40	4	10,0 %	80,0
1: 80	1	2,5 %	82,5
1:160	1	2,5 %	85,0
1:320	2	5,0 %	90,0
1:640	2	5,0 %	95,0
EA	2	5,0 %	100,0
	40	100,0 %	

Säuglinge: n = 26

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	16	61,5 %	61,5
1: 10	0	0,0 %	61,5
1: 20	1	3,8 %	65,3
1: 40	6	23,0 %	88,3
1: 80	1	3,8 %	92,1
1:160	1	3,8 %	95,9
EA	1	3,8 %	99,7
	26	99,7 %	

1-2jährige Kinder: n = 21

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	12	57,1 %	57,1
1: 10	0	0,0 %	57,1
1: 20	0	0,0 %	57,1
1: 40	0	0,0 %	57,1
1: 80	0	0,0 %	57,1
1:160	0	4,8 %	61,9
1:320	4	19,0 %	80,9
1:640	4	19,0 %	99,9
EA	0	0,0 %	
	21	99,9 %	

2-3jährige Kinder: n = 38

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	11	28,9 %	28,9
1: 10	1	2,6 %	31,5
1: 20	1	2,6 %	34,1
1: 40	1	2,6 %	36,7
1: 80	2	5,3 %	42,0
1:160	3	7,9 %	49,9
1:320	4	10,5 %	60,4
1:640	9	23,7 %	84,1
1:1280	2	5,3 %	89,4
EA	4	10,5 %	99,9
	38	99,9 %	

3-4jährige Kinder: n = 38

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	12	31,6 %	31,6
1: 10	2	5,3 %	36,9
1: 20	2	5,3 %	42,2
1: 40	1	2,6 %	44,8
1: 80	2	5,3 %	50,1
1:160	4	10,5 %	60,6
1:320	5	13,2 %	73,8
1:640	6	15,8 %	89,6
1:1280	1	2,6 %	92,2
EA	3	7,9 %	100,1
	38	100,1 %	

4-5jährige Kinder: n = 39

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	11	28,2 %	28,2
1: 10	7	17,9 %	46,1
1: 20	5	12,8 %	58,9
1: 40	5	12,8 %	71,7
1: 80	3	7,7 %	79,4
1:160	4	10,2 %	89,6
1:320	3	7,7 %	97,3
1:640	1	2,6 %	99,9
EA	0	0,0 %	99,9
	39	99,9 %	

5-6jährige Kinder: n = 49

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	20	40,8 %	40,8
1: 10	6	12,2 %	53,0
1: 20	5	10,2 %	63,2
1: 40	3	6,1 %	69,3
1: 80	7	14,3 %	83,6
1:160	0	0,0 %	83,6
1:320	2	4,1 %	87,7
1:640	1	2,0 %	89,7
EA	5	10,2 %	99,9
	49	99,9 %	

6-10jährige Kinder: n = 40

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	11	27,5 %	27,5
1: 10	5	12,5 %	40,0
1: 20	7	17,5 %	57,5
1: 40	6	15,0 %	72,5
1: 80	6	15,0 %	87,5
1:160	2	5,0 %	92,5
1:320	1	2,5 %	95,0
1:640	2	5,0 %	100,0
EA	0	0,0 %	100,0
	40	100,0 %	

11-2ojährige Jugendliche: n = 50

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	29	58,0 %	58,0
1: 10	6	12,0 %	70,0
1: 20	4	8,0 %	78,0
1: 40	5	10,0 %	88,0
1: 80	3	6,0 %	94,0
1:160	3	6,0 %	100,0
EA	0	0,0 %	100,0
	50	100,0 %	

Erwachsene: n = 50

Titer	Seren		kumulativ
1:<10	28	56,0 %	56,0
1: 10	8	16,0 %	72,0
1: 20	8	16,0 %	88,0
1: 40	5	10,0 %	98,0
1: 80	1	2,0 %	100,0
EA	0	0,0 %	100,0
	50	100,0 %	

Mittelwerte der Gesamt-Titer

	ohne 1: < 10	mit 1: < 10
Frühgeborene	160,6	32,6
Säuglinge	55,5	20,0
1-2jährige	444,4	190,5
2-3jährige	448,2	303,2
3-4jährige	331,3	217,7
4-5jährige	101,8	73,1
5-6jährige	88,3	48,2
6-1ojährige	97,6	70,75
11-20jährige	50,5	21,2
Erwachsene	23,6	10,4

Prozentuale Verteilung der Titer

	1:<10	1: ≥10	1:>40 (=1:≥80)
Frühgeborene	57,5 %	42,5 %	15,0 %
Säuglinge	61,5 %	38,5 %	7,6 %
1-2jährige	57,1 %	42,9 %	42,8 %
2-3jährige	28,9 %	71,1 %	52,7 %
3-4jährige	31,6 %	68,4 %	47,4 %
4-5jährige	28,2 %	71,8 %	28,2 %
5-6jährige	40,8 %	59,2 %	20,4 %
6-1ojährige	27,5 %	72,5 %	27,5 %
11-20jährige	58,0 %	42,0 %	12,0 %
Erwachsene	56,0 %	44,0 %	2,0 %

Abb. 4 stellt die Verteilung haemagglutinationshemmender Antikörper bezogen auf das Lebensalter dar.

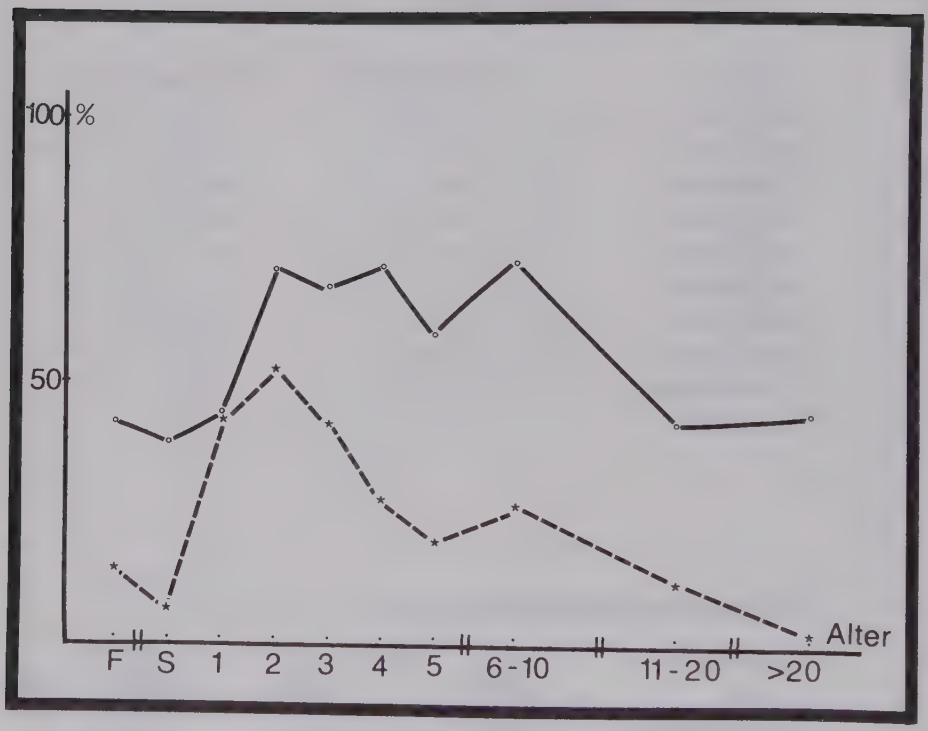
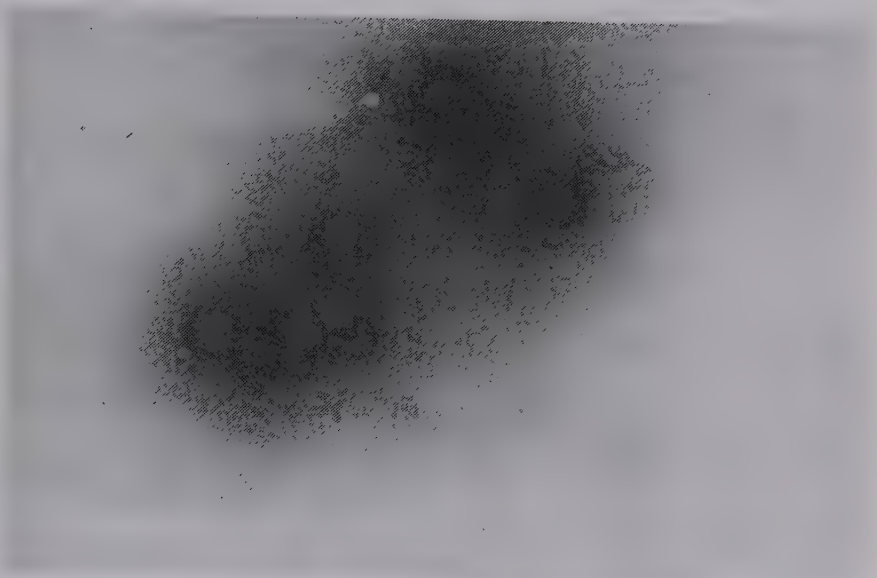


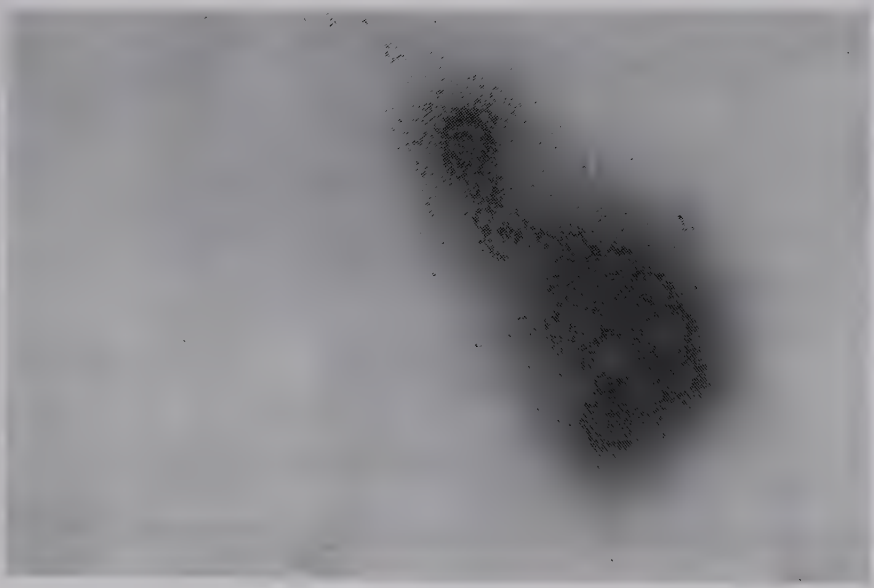
Abb.4: ——— Gesamt-Titer 1:≥ 10

- - - - - - Titer 1:≥ 80

D-7 Photos



SA-11-Virus. Die Mehrzahl der Viren zeigt ein intaktes äußeres Capsid, an welches die HA-Aktivität gebunden ist. Das innere Capsid scheint zum Teil herausgelöst. Außerdem sind freie Capsomere und Capsidteile zu sehen.



SA-11 Virus

E. Diskussion

Ein kultureller Erregernachweis war bisher bei der infantilen, nicht bakteriellen Gastroenteritis nicht möglich. Daher müssen zum Nachweis einer Rotavirus-Infektion entweder die Viren in den Faeces oder die Antikörper im Blut der Patienten nachgewiesen werden. Für beide Möglichkeiten stehen eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung.

Nachweis des Virus:

1.	Elektronenmikroskopischer Nachweis	(6)
2.	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis	(31,7,26)
3.	Enzymimmunoassay	(6)
4.	Solid-phase RIA, Microtiter-solid-phase-RIA	(18,9,14)
5.	Immunelektroosmophorese	(29,13)
9.	Counterimmunoelektrophorese	(27)
10.	Haemagglutinationstest	(7)

Nach Beendigung der Durchfälle kann das Virus nicht mehr nachgewiesen werden. Die Diagnose kann dann noch durch den Nachweis der gebildeten Antikörper gestellt werden.

Nachweis der Antikörper:

1.	Komplementbindungs-Reaktion	(12,20,21)
2.	Neutralisationstest	(23,24)
3.	Immune-Adherence-Hemagglutination	(23)
4.	Haemagglutinations-Hemm-Test	(22)
5.	Immunfluoreszenztest	(6)

Eine Untersuchung der Epidemiologie der Rotaviren mittels Virusnachweis hätte eine über längere Zeit sich hinziehende Longitudinal-Studie erfordert, während Seren zum größten Teil im Hygiene-Institut gesammelt vorlagen.

Nach Abwägung der Vor- und Nachteile der Methoden zur Bestimmung von Antikörpern und unserer technischen Möglichkeiten entschieden wir uns für die Haemagglutinations-Hemm-Reaktion, die leicht und kostengünstig anzuwenden ist und deren Ergebnisse innerhalb kurzer Zeit abgelesen werden können.
Bisher ist es nicht gelungen, das humane Rotavirus im Labor auf Zellinien zu züchten. Als Ersatzantigen kommt sowohl das Kälberrotavirus NCDV als auch das von Cercopithecus pygerythrus (Vervet monkey) stammende SA-11-Virus in Frage. Kälberviren vermehren sich am besten auf primären Kälbernierenzellen (2). Das SA-11-Virus jedoch ist gut auf von Affen stammenden Laborzellinien züchtbar, weshalb es sich als am besten geeignetes Ersatzantigen anbot.

Als Zellen für die Anzucht der SA-11-Viren wählten wir zunächst Verozellen und primäre Affennierenzellen, weil diese im Institut vorhanden waren. Der Erfolg war gering bei den Verozellen und etwas besser, jedoch nicht befriedigend, bei den Affennierenzellen. In der Literatur fand sich ein Hinweis auf erfolgversprechende Zellarten bei Estes et al. (10). Gute Virustiter erlangten diese Wissenschaftler mit folgenden Zellarten:

MA-104 (Rhesusaffen-Nieren-Zellen)
CV-1 (Cercopithecus äthiops-Nieren-Zellen)
BSC-1 (Cercopithecus äthiops-Nieren-Zellen)

Wir entschieden uns für CV-1-Zellen. Außerdem wurden die neu im Institut vorhandenen Frhk-4-Zellen (fetale Rhesusaffen-Nieren-Zellen) ausprobiert. In beiden Fällen hatten wir sehr gute Resultate. Obwohl es nun gelang, große Virusmengen zu züchten, traten zunächst Schwierigkeiten bei der Reinigung des Antigens auf. Die zuerst angewendete Methode stützte sich auf die Erfahrungen meiner Diplomarbeit (28), in der die Zelltrümmer stets verworfen werden konnten, da das Kälber-Rotavirus offenbar nur in

unerheblichem Maße an den Zellen anhaftet. Nach der Entfernung der Zelltrümmer von den mit SA-11 infizierten Kulturen wurde deshalb das verbliebene Medium eingeengt und durch ein CsCl-Kissen zentrifugiert, in der Erwartung, das Virus pelletieren zu können.

Die elektronenmikroskopische Kontrolle der verschiedenen Fraktionen zeigte aber einen sehr geringen Virusgehalt, wies jedoch den richtigen Weg, da man sehen konnte, daß die Viren größtenteils an Resten von Zelltrümmern adhärent waren. Nach Estes et al. (10) befinden sich die Viren je nach Zellart in unterschiedlichem Maße in der zellulären Fraktion. Estes et al. fanden dabei bei CV-1-Zellen einen hohen Prozentsatz von 78 %, bei Verozellen jedoch nur 45 % zellassoziiert. Grob geschätzt dürfte in meinen Untersuchungen der zellassoziierte Anteil noch höher gelegen haben.

Nach dem Mißerfolg mit dieser Reinigungsmethode wurde das Antigen wie bei Martin et al. (22) beschrieben geerntet und mit Aqua dest. und mit Trichlortrifluoräthylen extrahiert, danach nach Kalica et al. (17) über einen CsCl-Gradienten zentrifugiert. Maximale HA-Aktivität zeigt sich im Mittelwert von drei Läufen bei ρ = 1,316.

Damit ergab sich Übereinstimmung mit der Arbeit von Kalica et al. (17), die ebenfalls die HA-Aktivität bei ρ = 1,316 g/cm³ lokalisierten, allerdings mit Hilfe des RIA noch drei andere Aktivitäts-Peaks ausmachten. Dennin (9) fand jedoch einen Wert von ρ = 1,36 g/ml. Nach den Untersuchungen von Kalica ist die HA-Aktivität an das äußere Capsid gebunden. Bei der Dichte von 1,316 fanden sich in seiner Arbeit 90 % der Viren mit intaktem äußeren Capsid, während in den anderen Fraktionen 70 % kein äußeres Capsid mehr besaßen. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen meiner Arbeit zeigte die überwiegende Mehrzahl der Viren ein intaktes äußeres Capsid, während jedoch zum Teil das innere Capsid herausgelöst schien. Außerdem zeigten sich einige freie Capsomere und Capsid-Teile (vgl. Photos).

Mit dem HAI-Test wurde eine Anzahl menschlicher Seren verschiedener Altersgruppen untersucht,wobei sich deutliche Unterschiede in der Antikörperverteilung zeigten.

Zunächst läßt sich feststellen, daß sich sowohl unter den Frühgeborenen wie auch unter den Säuglingen bereits Kinder mit hohem Antikörpertiter finden. Allerdings handelte es sich bei den untersuchten Seren um Patientenseren aus der Kinderklinik; diese Kinder können meist nicht durch Muttermilch ernährt werden. Es ist bekannt, daß Rotavirus-Infektionen in Kinderkliniken häufig endemisch auftreten (1,3). Oft breitet sich die Infektion in wenigen Tagen über eine ganze Station aus. Jedoch sind auch Kinder mit einem niedrigen Titer vorhanden. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um transplazentar übertragene Antikörper der Mutter. Offensichtlich haben diese keine große Schutzwirkung. Interessant ist, daß die in Kolostrum und Muttermilch nachgewiesenen Antikörper (8,9) eine protektive Funktion auszuüben scheinen, da brusternährte Kinder seltener an Darminfektionen erkranken. 1-3jährige Kinder zeigten die höchsten Titer und auch einen deutlich höheren Prozentsatz an hohen Titern. Dieser verschob sich bereits bei den 4-5Jährigen zu niedrigeren Titerstufen. Dieser Trend setzte sich bis ins Erwachsenenalter fort, jedoch zeigten selbst bei den Erwachsenen noch 2 % einen Titer von 1:80. Bei den Seren der Erwachsenen handelte es sich um Seren der Blutbank Tübingen. Erfahrungsgemäß stammt ein hoher Prozentsatz der Blutbankseren von medizinischem Personal, das viele Kontaktmöglichkeiten mit Krankheitserregern hat. Der durchschnittliche Titer der Normalbevölkerung dürfte eher niedriger liegen. In der Literatur sind akute Infektionen durch Rotaviren selbst bei alten Menschen beschrieben (15).

Eine jahreszeitliche Prävalenz, die von einigen Untersuchern angegeben wird und die sich auch in dem Namen "winter-gastoenteritis" und "winter-vomiting-desease" ausdrückt, war nicht festzustellen (Daten sind nicht angegeben).

Vergleichbare Untersuchungen wurden von Stövesand (32) vorgenommen. Stövesand untersuchte menschliche Seren mit Hilfe der KBR auf Antikörper, die das dem menschlichen Rotavirus verwandte Kälbervirus NCDV unter Komplementverbrauch binden. Ein Hauptunterschied zwischen KBR und HAI besteht darin, daß durch die KBR alle Antigene gemessen werden, während der HAI-Test nur die Oberflächenantigene erfaßt. Unterschiedliche Ergebnisse sind möglicherweise mit durch diesen Umstand bedingt.

Titer von 1:≥ 4 ergaben sich bei Stövesand bereits bei 40 % der 9 Monate alten Säuglinge. Ebenso wurde ein Maximum von fast 50 % bei 2jährigen Kindern gefunden. In meinen Untersuchungen hatten 42,8 % der 1-2jährigen Kinder und 52,7 % der 2-3jährigen Kinder einen HAI-Titer von 1:≥ 80.

Divergierend ergab sich bei Stövesand et al. ein Antikörpersturz bei 10-15 Monate alten Kindern, den er auf den Abbau der diaplazentar übertragenen Antikörper zurückführt. Allerdings sind in seinen Untersuchungen die Altersstufen in 2-3 Monate große Grüppchen unterteilt, sodaß solche kurzfristigen Schwankungen in der von uns vorgenommenen Einteilung nicht erscheinen.
Unterschiedlich ist auch der Antikörpertiterverlauf bei Kindern, die älter als 3 Jahre sind. Bei Stövesand betrug der Prozentsatz der 3-4Jährigen, die einen KBR-Titer von 1:≥ 4 aufwiesen, noch zwischen 40 und 50 %, während in meinen Untersuchungen in dieser Altersstufe eine abfallende Tendenz auffällig ist. 3-Jährige besitzen danach noch zu 47,4 % einen Antikörpertiter von 1:≥ 80, während dieser Prozentsatz bereits bei den 4-Jährigen auf 28,2 % abfällt. Bei den 7-8-Jährigen klettert in Stövesands Untersuchung die Zahl auf mehr als 50 %; bei den 5-10-Jährigen ist sie bei mir bereits auf 27,5 % abgefallen.

Als übereinstimmendes Ergebnis läßt sich feststellen, daß die häufigsten Infektionen im 2. Lebensjahr stattfinden. Welche epidemiologischen oder technischen Faktoren die

unterschiedlichen Ergebnisse bei den älteren Kindern verursacht haben könnten, bleibt noch zu klären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es sich beim HAI-Test mit dem SA-11-Virus als Antigen um eine zuverlässige und schnelle Methode handelt, um Rotaviren als Verursacher einer Diarrhoe zu diagnostizieren, die sicherlich bald durch industrielle Herstellung normiert und in die Routine-Diagnostik eingeführt werden kann.

F ZUSAMMENFASSUNG

Um in menschlichen Seren Antikörper gegen humanes Rotavirus diagnostizieren zu können, kann man im Haemagglutinations-Hemm-Test Affen-Rotavirus (SA-11) als Ersatzantigen verwenden.

Zur Herstellung eines solchen Antigens wurden zunächst drei Permanentlinien von Affennierenzellen, sowie Primärzellen von Cercopithecus Äthiops auf ihre Eignung zur Züchtung des SA-11 überprüft. Das gezüchtete Virus wurde durch Zentrifugation über einen CsCl-Gradienten gereinigt und einesteils zur Immunisierung von Meerschweinchen, anderenteilsals haemagglutinierendes Antigen im Haemagglutinations-Hemm-Test (hAI) verwendet. Durch mehrfache Injektion dieses Antigens ließen sich von Meerschweinchen hochtitrige Immunseren gewinnen.

Das Antigen wurde sodann zur Erstellung eines Antikörperkatasters verwendet. Seren von Personen aus Einsendungen zur allgemeinserologischen Diagnostik verschiedener Altersstufen wurden auf ihre haemagglutinationshemmenden Eigenschaften untersucht.

Im ersten Lebensjahr ließen sich bei über 60% keinerlei haemagglutinationshemmende Substanzen nachweisen und nur vereinzelte Seren zeigten Titer ≥ 80. Im dritten Lebensjahr war der Prozentsatz der Seren, die keine Antikörper enthielten, auf etwa 30% abgesunken und mehr als die Hälfte der Seren hatten Titer ≥ 80. Ab dem fünften Lebensjahr sanken die Titerhöhen steil ab und zum Teil offenbar unter die Nachweisbarkeitsgrenze, so daß bei den Erwachsenen sich bei fast 50% der untersuchten Seren keine Antikörper mehr nachweisen ließen.

G. LITERATUR

1) Albrey, M.B.; Murphy, A.M.:
Rotaviruses and acute gastroenteritis of infants and children.
Med. J. Aust., 1, 82-85, (1976)

2) Almeida, J.D.; Hall, T.; Banatvala, J.E.; Totterdell, B.M.; Chrystie, J.L.:
The effect of trypsin on the growth of rotavirus.
J. gen. Virol., 40, 213-218, (1978)

3) Banatvala, J.E.; Chrystie, J.L.; Totterdell, B.M.:
Rotaviral infections in human neonates.
J. Am. vet. med. Assoc., 173, 527-530, (1978)

4) Bishop, R.F.; Davidson, G.P.; Holmes, J.H.; Ruck, B.J.:
Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis.
Lancet, (1973), 2, 1281-1283

5) Bradburne, A.F.; Almeida, J.D.; Gardner, P.S.; Moosai, R.B.; Nash, A.A.; Coombs, R.R.A.:
A solid-phase system (SPACE) for the detection and quantification of rotavirus in faeces.
J. gen. Virol., 44, 615-623, (1979)

6) Brade, L.:
Rotaviren: Ursache akuter Gastroenteritiden bei Säuglingen und Kleinkindern.
Dtsch. med. Wschr., 104, 991-993, (1979)

7) Bryden, A.S.; Davies, H.; Thouless, M.E.; Flewett, T.H.:
Diagnosis of rotavirus infection by cell culture.
J. Med. Microbiol., 10, 121-125, (1977)

8) Cukor, G.; Blacklow, N.R.; Capozza, F.E.; Panjvani, Z.F.K.; Bednarek, F.:
Persistence of antibodies to rotavirus in human milk.
J. Clin. Microbiol., 9, 93-96, (1979)

9) Dennin, R.H.:
Rotaviren als Erreger einerinfantilen Gastroenteritis - Diagnose und Epidemiologie.
Immun. Infekt., 6, 118-122, (1978)

10) Estes, M.K.; Graham, D.Y.; Gerba, C.P.; Smith, E.M.:
Simian rotavirus SA-11 replication in cell cultures.
J. Virol., 31, 810-815, (1979)

11) Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H.:
Virus particles in gastroenteritis.
Lancet, (1973), 2, 1497

12) Gust, J.D.; Pringle, R.C.; Barnes, G.L.; Davidson, G.P.; Bishop, R.F.:
Complement-fixing antibody response to rotavirus infection.
J. Clin. Microbiol., 5, 125-130, (1977)

13) Grauballe, P.C.; Genner, J.; Meyling, A.;Hornsleth, A.:
Rapid diagnosis of rotavirus infections: Comparison of electron microscopy and immunoelectroosmophoresis for the detection of rotavirus in human infantile gastroenteritis.
J. gen. Virol., 35, 203-218, (1977)

14) Greenberg, H.B.; Wyatt, R.G.; Valdesuso, J.; Kalica, A.R.; London, W.T.; Chanock, R.M.; Kapikian, A.Z.:
Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of the Norwalk strain of acute, nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies.
J. Med. Virol., 2, 97-108, (1978)

15) Halvorsrud, J.; Örstavik, J.:
An epedemic of rotavirus-associated gastroenteritis in a nursing home for the elderly.
Scand. J. Infect. Dis., 12, 161-164, (1980)

16) Holmes, J.H.; Ruck, B.J.; Bishop, R.F.; Davidson, G.P.:
Infantile enteritis-viruses: Morphogenesis and morphology.
J. Virol., 16, 937-943, (1975)

17) Kalica, A.R.; James, H.D.; Kapikian, A.Z.:
Hemagglutination by Simian Rotavirus.
J. Clin. Microbiol, 7, 314-315, (1978)

18) Kalica, A.R.; Purcell, R.H.; Sereno, M.M.; Wyatt, R.G.; Kim, H.W.; Chanock, R.M.; Kapikian, A.Z.:
A microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of the human reovirus-like agent in stools.
J. Immunol., 118, 1275-1279, (1977)

19) Kapikian, A.Z. et al.:
Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children.
N. Eng. J. Med., 294, 965-972, (1976)

20) Kapikian, A.Z. et al.:
New complement-fixation test for human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis.
Lancet, (1975), 1, 1056-1060

21) Kapikian, A.Z. et al.:
Antigenic relationships among five reovirus-like (RVL) agents by complement fixation (CF) and developmen of new substitute CF antigens for human RVL agent of infantile gastroenteritis (39434).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 152, 535-539, (1976)

22) Martin, M.L.; Gary, G.W. jr.; Palmer, E.L.:
Comparison of hemagglutination-inhibition, complement-fixation and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human rotavirus antibodies.
Arch. Virol., 62, 131-136, (1979)

23) Matsuno, S.; Inouye, S.; Kono, R.:
Antigenic relationship between human and bovine rotaviruses as determined by neutralization, immune adherence hemagglutination and complement fixation tests.
Infect. Immun., 17, 661-662, (1977)

24) Matsuno, S.; Inouye, S.; Kono, R.:
Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera.
J. Clin. Microbiol., 5, 1-4, (1977)

25) Melnick, J.L.:
Taxonomy of viruses 1979.
Progress in Medical Virology, 25, 160-166, (Karger, Basel 1979)

26) Peterson, M.W.; Spendlove, R.S.; Smart, R.A.:
Detection of neonatal calf diarrhea virus, infant reovirus-like diarrhea virus, and a caronavirus, using the fluorescent virus precipitin test.
J. Clin. Microbiol., 3, 376-377, (1976)

27) Spence, L.; Fauvel, M.; Petro, R.; Block, S.:
Comparison of counterimmunoelectroosmophoresis and electron microscopy for laboratory diagnosis of human reovirus-like agent-associated infantile gastroenteritis.
J. Clin. Microbiol., 5, 248-249, (1977)

LEBENSLAUF

Am 17.3.1952 wurde ich, Maria Deborah Schubert-Rajab, geb. Schubert, als Tochter des Physikers Prof. Dr. Konrad Schubert und seiner Ehefrau Ruth Schubert in Stuttgart-Feuerbach geboren.
Von 1958 – 1962 besuchte ich die Grundschule und danach das Gymnasium in Feuerbach, wo ich 1970 mein Abitur ablegte. 1971 nahm ich das Studium der Biologie in Tübingen auf, welches ich im Frühjahr 1977 mit dem Diplom abschloß. Bereits vorher, 1976, immatrikulierte ich mich im Fach Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Am 12. Oktober 1982 bestand ich das Staatsexamen.
Seit 1978 bin ich mit meinem Mann, Dr. H. Rajab, verheiratet. Wir haben einen Sohn.